บทที่ 4

สรุปและอภิปรายผลการทดลอง

1. การแยกและจำแนกสาหร่าย *Chlorella* sp.

การวิจัยในครั้งนี้ได้ทำการแยกสาหร่าย *Chlorella* sp. จากตัวอย่างน้ำจากสถานที่ต่าง ๆ ในกรุงเทพมหานครรวมทั้งสิ้น 5 แหล่ง สามารถแยกสาหร่ายที่มีลักษณะคล้าย *Chlorella* sp. บนอาหารวุ้นแข็งได้ 3 สายพันธุ์ แต่เมื่อทำการถ่ายเชื้อหลาย ๆ ครั้ง เพื่อทำให้บริสุทธิ์มากขึ้นพบว่าเหลืออยู่เพียงสายพันธุ์เดียวเท่านั้น ซึ่งเมื่อทำการจำแนกตาม key ที่รายงานใน Bold และ Wynne พบว่าสาหร่ายที่ได้อยู่ในสกุล *Chlorella* ที่เหลืออีกสองสายพันธุ์ไม่สามารถเจริญต่อไปได้ จึงส่งไปตรวจสอบยืนยันที่ประเทศญี่ปุ่น ณ สถาบัน Japan Dairy Technical Association พบว่าเป็น *Chlorella* sp. จริงและเมื่อทำการจำแนกชนิดของสาหร่ายพบว่ามีลักษณะคล้าย *Chlorella ellipsoidea* ซึ่ง *Chlorella* sp. B.K.1 ที่ได้จะไม่มีการปนเปื้อนจากสาหร่ายชนิดอื่น แต่มีแบคทีเรียบางชนิดปนเปื้อนอยู่เล็กน้อยซึ่งไม่มีผลต่อการทดลองนี้แต่อย่างไรถือว่าเป็น Unialgal culture

2. อัตราการให้อากาศที่เหมาะสม

การให้อากาศแก่ *Chlorella* sp. B.K.1 เป็นการกวนอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อไม่ให้สาหร่ายตกตะกอน และละเพื่อที่สาหร่ายจะได้รับแสงอย่างทั่วถึง ในการทดลองนี้จะหาอัตราการให้อากาศที่เหมาะสม สำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อบริมาตร 250 มล.ในขวดแก้วทรงกรวยขนาด 500 มล. ทั้งนี้เพราะถ้าปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อและภาชนะบรรจุในการเพาะเลี้ยงต่างกัน อัตราการให้อากาศจะต่างกันไปจากการทดลองพบว่าที่อัตราการให้อากาศ 40, 60 และ 80 มล.ต่อนาที จะให้ค่าอัตราการเจริญจำเพาะใกล้เคียงกัน แต่เมื่อดูจากจำนวนเซลล์จะเห็นว่าที่อัตราการให้อากาศ 10, 20, 40, 60 และ 80 มล.ต่อนาที มีค่าต่างกันไม่มาก และปริมาณสาหร่ายมีน้อยมากจึงไม่ได้ทำการหาน้ำหนักแห้งและปริมาณโปรตีน แสดงให้เห็นว่าการให้อากาศอย่างเดียวจะมีผลต่อการเจริญของสาหร่ายน้อยมาก ดังนั้นการให้อากาศจึงถือว่าเป็นสิ่งทำหน้าที่ในการกวนอาหารเลี้ยงเชื้อเท่านั้น เพราะปริมาณแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ในอากาศจะมีเพียง

0.03 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นในการเลี้ยง Chlorella sp. B.K.1 ในสภาวะ Autotrophic จึงต้องเพิ่มปริมาณแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ให้มากขึ้น

3. การเลี้ยง Chlorella sp. B.K.1 ในสภาวะ Autotrophic

3.1 ในการเลี้ยง Chlorella sp.B.K.1 ในสภาวะ Autotrophic ที่ความเข้มแสง 3500 ลักซ์ จากการทดลองสุ่มหาช่วงอัตราการให้อากาศผสมแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ 1 เปอร์เซ็นต์ พบว่าที่อัตราการให้อากาศ 40, 60 และ 80 มล.ต่อนาที จะให้ค่าอัตราการเจริญจำเพาะใกล้เคียงกัน จึงเลือกอัตราการให้อากาศทั้ง 3 นี้มาทำการทดลองซ้ำ 10 ซ้ำ เพื่อดูว่าที่อัตราใดจะให้การเจริญและผลผลิตดีที่สุด พบว่าที่อัตราการให้อากาศ 60 มล.ต่อนาที จะให้อัตราการเจริญจำเพาะสูงสุดคือ 0.028 ชม.$^{-1}$และผลผลิตคือ 7.010 ไมโครกรัมต่อมล.ต่อชม. และค่าทั้งสองนี้จะลดลงที่อัตราการให้อากาศ 80 มล.ต่อนาที

ปริมาณโปรตีนที่หาจากวิธีแบรดฟอร์ด และ จากวิธีวัดค่าดูดกลืนแสงอุลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร พบว่าที่อัตราการให้อากาศ 60 และ 80 มล.ต่อนาที ให้ค่าโปรตีนที่ไม่ต่างกัน คือประมาณ 42 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อน้ำหนักแห้ง) แต่มากกว่าที่อัตราการให้อากาศที่ 40 มล.ต่อนาที คือมีค่าประมาณ 25 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อน้ำหนักแห้ง)

จากผลการทดลองแสดงว่าการเพิ่มปริมาณแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ ทำให้ Chlorella sp.B.K.1 สามารถเจริญได้ดีขึ้น และทำให้มีผลผลิตเพิ่มมากขึ้นด้วย แต่ที่อัตราการให้อากาศ 80 มล.ต่อนาที จะทำให้ค่าอัตราการเจริญจำเพาะและผลผลิตลดลง แสดงว่าการให้แก๊สคาร์บอนได-ออกไซด์ มากเกินไปจะเกิดการยับยั้งการเจริญของ Chlorella sp. B.K.1 ซึ่งอาจเกิดจากความดันย่อย ตามที่ Silva และ Pirt (1984) รายงานไว้ว่าถ้าความดันย่อยของแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ สูงถึง 0.6 บรรยากาศ แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์จะยับยั้งการเจริญของ Chlorella vulgaris 211/8K

การยับยั้งการเจริญของ Chlorella sp. B.K.1 โดยแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ที่อัตราการให้อากาศ 80 มล.ต่อนาที ไม่มีผลต่อเปอร์เซ็นต์โปรตีนของ Chlorella sp.B.K.1 แต่ที่อัตราการให้อากาศ 40 มล.ต่อนาที จะมีผลทำให้ปริมาณโปรตีนลดลง ทั้งนี้อาจมีสาเหตุมาจากการมีปริมาณคาร์บอนน้อย และในการสร้างโปรตีนจำเป็นต้องมีคาร์บอนเป็นองค์ประกอบ ซึ่งสอดคล้องกับที่ Becker และ Venkataraman (1980) กล่าวว่าในภาวะที่ขาดคาร์บอนจะทำให้สาหร่ายมีปริมาณโปรตีนลดลงและมีเถ้าเพิ่มขึ้น

ศูนย์วิทยทรัพยากร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ดังนั้นจึงเลือกใช้ อากาศผสมแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ 1 เปอร์เซ็นต์ ที่อัตราการให้อากาศ 60 มล.ต่อนาที

3.2 การเลี้ยง <u>Chlorella</u> sp. B.K.1 ในสภาวะ Autotrophic ที่ความเข้มแสง 1750 ลักซ์ การเลี้ยง <u>Chlorella</u> sp. B.K.1 ในสภาวะ Autotrophic ที่ความเข้มแสง1750 ลักซ์ ที่อัตราการให้อากาศผสมคาร์บอนไดออกไซด์ 1 เปอร์เซ็นต์ 60 มล.ต่อนาที จะให้อัตราการเจริญจำเพาะ, ผลผลิต และ ปริมาณโปรตีนที่หาจากวิธีแบรดฟอร์ด และ จากวิธีวัดค่าดูดกลืนแสงอุลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร ต่ำกว่าที่การเลี้ยงในสภาวะ Autotrophic ที่ความเข้มแสง 3500 ลักซ์ โดยการเลี้ยงในสภาวะ Autotrophic ที่ความเข้มแสง 1750 ลักซ์ จะมีค่าอัตราการเจริญจำเพาะ 0.012 ชม.$^{-1}$, ปริมาณผลผลิต 0.610 ไมโครกรัมต่อมล.ต่อชม. และ ปริมาณโปรตีนที่หาจากวิธีแบรดฟอร์ด และ จากวิธีวัดค่าการดูดกลืนแสงอุลตราไวโอเลตเท่ากับ 34.52 และ 34.78 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อน้ำหนักแห้ง) ตามลำดับ ทั้งนี้เกิดจากแสงที่ให้ในการสังเคราะห์แสงมีน้อยมากทำให้การเจริญและผลผลิตลดลง

4. <u>การเลี้ยง Chlorella sp.B.K.1 ในสภาวะ Heterotrophic ในที่มืด</u>

จากการทดลองสุ่มหาความเข้มข้นของกรดแอซีติก พบว่า ที่ความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ จะให้อัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด ในขณะที่จำนวนเซลล์ต่อมล.และ ค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร ที่ชั่วโมงที่ 164 ต่ำกว่าที่ความเข้มข้นอื่น ซึ่งอาจเกิดเนื่องจากปริมาณกรดแอซีติกหมด

จากรูปที่ 19 แสดงจำนวนเซลล์ต่อมล.พบว่า ที่ความเข้มข้น กรดแอซีติก 30,50 และ 60 มิลลิโมลาร์ จะให้การเจริญใกล้เคียงกัน และจากรูปที่ 20 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร พบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของกรดแอซีติกจะทำให้การเจริญของ <u>Chlorella</u> sp.B.K.1 เพิ่มขึ้น และการเจริญจะเริ่มลดลงที่ความเข้มข้นกรดแอซีติก 60 มิลลิโมลาร์ ดังนั้นจึงเลือกช่วงความเข้มข้นกรดแอซีติกที่ 30,40 และ 50 มิลลิโมลาร์ มาทำการทดลองใหม่อีก 10 ซ้ำ เพื่อหาค่าที่ให้การเจริญและผลผลิตสูงสุด จากการทดลองพบว่าทั้ง 3 ความเข้มข้น ให้ค่าอัตราการเจริญจำเพาะ, ผลผลิต, และ ปริมาณโปรตีนไม่ต่างกัน แต่จากการทดลองของ Endo และคณะ (1977) พบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของกรดแอซีติก อัตราการเจริญของ <u>Chlorella</u> <u>regularis</u> S-50 จะเพิ่มขึ้นจนกระทั่งคงที่ และที่ความเข้มข้น

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กรดแอซีติก 40 มิลลิโมลาร์ การเจริญจะถูกยับยั้ง การที่ความเข้มข้นที่ยับยั้งการเจริญของ Chlorella sp.B.K.1 ไม่เท่ากันกับของ Endo และคณะ อาจเกิดเนื่องจากเป็น Chlorella คนละชนิดและสายพันธุ์ ซึ่งความแตกต่างนี้อาจทำให้ทนต่อความดันออสโมติกได้ไม่เท่ากัน

ดังนั้นในการทดลองต่อ ๆ ไปจึงเลือกใช้กรดแอซีติกที่ความเข้มข้น 30 มิลลิโมลาร์ ในการเพาะเลี้ยง Chlorella sp. B.K.1 ในภาวะ Heterotrophic และ Mixotrophic

5. การเลี้ยง Chlorella sp. B.K.1 ในสภาวะ Mixotrophic ที่ความเข้มแสง 3500 ลักซ์ เปรียบเทียบกับการเลี้ยงในสภาวะ Heterotrophic ในที่มืด และ Autotrophic ที่ความเข้มแสง 3500 ลักซ์

เมื่อเปรียบเทียบอัตราการเจริญจำเพาะพบว่า อัตราการเจริญจำเพาะของการเจริญในสภาวะ Autotrophicซึ่งให้อากาศผสมคาร์บอนไดออกไซด์ 1 เปอร์เซ็นต์ ที่อัตรา 60 มล.ต่อนาที ที่ความเข้มแสง 3500 ลักซ์ เท่ากับอัตราการเจริญจำเพาะของการเจริญในสภาวะ Heterotrophic ในที่มืด ซึ่งให้ กรดแอซีติกที่ความเข้มข้น 30 มิลลิโมลาร์ คือ 0.028 ชม.$^{-1}$ แต่การเจริญในสภาวะ Mixotrophic ที่ความเข้มแสง 3500 ลักซ์ ซึ่งให้กรดแอซีติกที่ความเข้มข้น 30 มิลลิโมลาร์ และอากาศผสมคาร์บอนไดออกไซด์ 1 เปอร์เซ็นต์ ที่อัตรา 60 มล.ต่อนาที มีอัตราการเจริญจำเพาะต่ำกว่า คือมีค่า 0.024 ชม.$^{-1}$ ซึ่งต่างจากการทดลองของ Endo และคณะ (1977) และ Ogawa และ Aiba (1981) ซึ่งพบว่าอัตราการเจริญจำเพาะของการเจริญในสภาวะ Mixotrophic เป็นผลรวมของ อัตราการเจริญจำเพาะของการเจริญในสภาวะ Autotrophic และ Heterophic ทั้งนี้การที่อัตราการเจริญจำเพาะของการเจริญในสภาวะ Mixotrophic ที่ความเข้มแสง 3500 ลักซ์ ต่ำกว่าอัตราการเจริญจำเพาะของการเจริญในสภาวะ Autotrophic ที่ความเข้มแสง 3500 ลักซ์ และ Heterophic อาจเกิดจากการจำกัดของแสงตามที่ Killam และ Myers (1956, อ้างถึงใน Ogawa และ Aiba, 1981) และ Samejima and Myers (1958) ว่าการเติม 1 เปอร์เซ็นต์ กลูโคสจะเร่งการเจริญต่อเมื่อความเข้มแสงอยู่ต่ำกว่าจุดอิ่มตัวเท่านั้น ถ้าแสงเกินจุดอิ่มตัวของการเจริญในสภาวะ Mixotrophic การเติมกลูโคสจะไม่มีผลต่อการเร่งการเจริญของ Chlorella spp. ดังนั้นในงานวิจัยนี้ที่ความเข้มแสง 3500 ลักซ์ อาจเป็นจุดอิ่มตัวหรือเกินจุดอิ่มตัวของการเจริญในสภาวะ Mixotrophic ทำให้การเจริญในสภาวะ Mixotrophic มีอัตราการเจริญจำเพาะไม่เป็นผลรวมของอัตราการเจริญจำเพาะของการเจริญในสภาวะ Autotrophic และ

ศูนย์วิทยทรัพยากร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Heterotrophic แต่การที่มีค่าต่ำลงอาจเนื่องมาจากสาหร่ายใช้แต่คาร์บอนไดออกไซด์ หรือใช้กรดแอซีติกน้อย ดังนั้นจึงมีกรดแอซีติกเหลืออยู่ในอาหารมาก ทำให้เกิดความดันออสโมติก ซึ่งอาจจะมีผลทำให้อัตราการเจริญลดลงได้ จากการทดลองของ Endo และคณะ (1977) ก็ให้ผลเช่นเดียวกันคือการเจริญในสภาวะ Mixotrophic ต้องการแสงในการเจริญน้อยกว่าการเจริญในสภาวะ Autotrophic โดยในการทดลองของ Endo พบว่าที่ความเข้มแสง 15,000 ลักซ์ จะทำให้อัตราการเจริญจำเพาะของการเจริญในสภาวะ Mixotrophic ลดลงแต่อัตราการเจริญจำเพาะของการเจริญในสภาวะ Autotrophic ไม่ลดลง และความเข้มแสงของการเจริญในสภาวะ Autotrophic จะอิ่มตัวที่ประมาณ 35,000 ลักซ์ และจากตารางที่ 4 ที่แสดงให้เห็นว่าอัตราการเจริญจำเพาะของการเจริญในสภาวะ Mixotrophicเป็นผลรวมของอัตราการเจริญในสภาวะ Autotrophic และ อัตราการเจริญจำเพาะของการเจริญในสภาวะ Heterotrophic ก็ทำการทดลองที่ความเข้มแสงเพียง 10000 ลักซ์เท่านั้น

ผลผลิตของการเจริญในสภาวะ Autotrophic จะสูงสุดคือ 7.01 ไมโครกรัมต่อมล.ต่อชม. และรองลงมาคือผลผลิตของการเจริญในสภาวะ Mixotrophic และ Heterotrophic ซึ่งเท่ากับ 5.042 และ 3.093 ไมโครกรัมต่อมล.ต่อชม. ตามลำดับ การที่ผลผลิตของ Heterotrophic มีค่าต่ำสุด เพราะเวลาที่ใช้ในการเลี้ยงนานกว่า และมีช่วง แลค เฟส ที่ยาวกว่าอีก 2 วิธี รวมทั้งขนาดของเซลล์จะเล็กกว่าซึ่งจะเห็นได้จากค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร ของการเจริญในสภาวะ Heterotrophic จะน้อยกว่าการเจริญในสภาวะ Autotrophic และ Mixotrophic ซึ่งเท่ากับ 0.80 ที่ชั่วโมงที่ 192, 1.74 และ 1.32 ที่ชั่วโมงที่ 121 ตามลำดับ ในขณะที่จำนวนเซลล์ใกล้เคียงกันทั้ง 3 วิธี คือการเจริญในสภาวะ Autotrophic และ Mixotrophic มีจำนวนเซลล์เท่ากับ 1.5×10^{11}, 1.1×10^{11} เซลล์ต่อมล. ที่ชั่วโมงที่ 121 และการเจริญในสภาวะ Heterotrophic มีจำนวนเซลล์เท่ากับ 1.2×10^{11} เซลล์ต่อมล. ที่ชั่วโมงที่ 192 รวมทั้งเมื่อคิดน้ำหนักแห้งของการเจริญในสภาวะ Autotrophic และ Mixotrophic จะเท่ากับ 848.21 และ 610.08 ไมโครกรัมต่อมล. เมื่อจำนวนเซลล์ใกล้เคียงกัน ซึ่งเป็นข้อยืนยันได้ว่า เซลล์ที่เลี้ยงในสภาวะ Heterotrophic มีขนาดเล็กกว่าเซลล์ที่เลี้ยงในสภาวะ Mixotrophic และ Autotrophic ตามลำดับ

การหาปริมาณโปรตีนทั้งวิธีเบรดฟอร์ดและวิธีดูดกลืนแสงอุลตร้าไวโอเลตพบว่าในภาวะ Mixotrophic จะให้ปริมาณโปรตีนมากกว่าในภาวะ Autotrophic และ Heterotrophic

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

(ซึ่งมีค่าไม่ต่างกัน) แสดงว่า Chlorella sp.B.K.1 สามารถใช้ทั้งคาร์บอนไดออกไซด์ และกรดแอซีติกได้ โดยอาจใช้กรดแอซีติกได้ไม่มาก แต่ทำให้โปรตีนเพิ่มขึ้น ทั้งนี้การที่โปรตีนเพิ่มขึ้นอาจเป็นเพราะ Chlorella sp. B.K.1 สามารถนำกรดแอซีติกไปสร้างโปรตีน โดยผ่านทางวัฏจักร กรดซิตริก ได้นอกเหนือจากการสร้างโปรตีนจากคาร์บอนไดออกไซด์

6. การเลี้ยง Chlorella sp. B.K.1 ในสภาวะ Mixotrophic ที่ความเข้มแสง 1750 ลักซ์ เปรียบเทียบกับการเลี้ยงในสภาวะ Heterotrophic ในที่มืด และ Autotrophic ที่ความเข้มแสง 1750 ลักซ์

เมื่อเปรียบเทียบอัตราการเจริญจำเพาะ พบว่าอัตราการเจริญจำเพาะของการเจริญในสภาวะ Mixtrophic ที่ความเข้มแสง 1750 ลักซ์ จะมีค่าสูงสุดคือ 0.032 ชม.$^{-1}$ และ อัตราการเจริญจำเพาะของการเจริญในสภาวะ Autotrophic และ Heterotrophic เท่ากับ 0.012 และ 0.028 ชม$^{-1}$ ตามลำดับ ซึ่งแม้ว่าอัตราการเจริญจำเพาะของการเจริญในสภาวะ Mixotrophic จะไม่เท่ากับผลรวมของอัตราการเจริญจำเพาะของการเจริญในสภาวะ Autotrophic และ Heterotrophic ตามการทดลองของ Endo และคณะ (1977) และ ogawa และ Aiba (1981) แต่การเจริญในสภาวะ Mixotrophic ที่ความเข้มแสง 1750 ลักซ์ นี้ก็ให้ค่าอัตราการเจริญจำเพาะมากกว่าการเจริญในสภาวะ Autotrophic ที่ความเข้มแสง 1750 ลักซ์ และการเจริญในสภาวะ Heterotrophic ในที่มืด แสดงว่า Chlorella sp. B.K.1 ที่เลี้ยงในภาวะ Mixotrophic ที่ความเข้มแสง 1750 ลักซ์ สามารถใช้ได้ทั้งคาร์บอนไดออกไซด์ และ กรดแอซีติกในการเจริญ นอกจากอัตราการเจริญจำเพาะแล้ว ผลผลิต และปริมาณโปรตีนที่หาจากวิธีแบรดฟอร์ด และจากวิธีวัดค่าดูดกลืนแสงอุลตราไวโอเลต ของการเจริญในสภาวะ Mixotrophic ที่ความเข้มแสง 1750 ลักซ์ ให้ค่าสูงสุดเช่นกันคือมีผลผลิต 6.871 ไมโครกรัมต่อมล.ต่อชม. และปริมาณโปรตีนจากวิธีแบรดฟอร์ดและจากวิธีวัดค่าดูดกลืนแสงอุลตราไวโอเลตเท่ากับ 55.34 และ 55.53 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อน้ำหนักแห้ง)

จากรูปที่ 29, 30 และตารางที่ 21 จะเห็นว่า ที่ความเข้มแสง 1750 ลักซ์ สาหร่าย Chlorella sp.B.K.1 ที่เลี้ยงในภาวะ Autotrophic ให้ผลผลิตเพียง 0.610 ไมโครกรัมต่อมล.ต่อชม. ซึ่งต่ำมาก แสดงว่าแหล่งคาร์บอนส่วนใหญ่ที่ Chlorella sp.B.K.1 ใช้ในภาวะ Mixotrophic ที่ความเข้มแสง 1750 ลักซ์ เป็นกรดแอซีติกมากกว่าคาร์บอนไดออกไซด์ นอก

จากนี้ผลผลิต และการเจริญของการเลี้ยงในสภาวะ Heterotrophic ต่ำกว่าการเลี้ยงในสภาวะ Mixotrophic มาก ทั้งนี้อาจเกิดเนื่องจากในการเลี้ยงในสภาวะ Mixotrophic มีแสงซึ่งจะให้พลังงานในการเจริญ ทำให้สามารถใช้กรดแอซีติกได้ดีขึ้น เพราะในการที่จะเปลี่ยนกรดแอซิติกเข้าสู่วัฏจักรกรดซิติก หรือ วัฏจักรไกลออกซีเลตนั้น กรดแอซิติกจะต้องเปลี่ยนเป็น Acety1 CoA ก่อน ซึ่งต้องใช้พลังงานคือ ATP

Acetate + CoA + ATP -----------> Acety1 CoA + AMP + PPi

ซึ่งพลังงานนี้ก็ได้มาจากการสังเคราะห์แสง (Stryer, 1988) และด้วยเหตุผลเดียวกันนี้ทำให้การเจริญของ Chlorella sp.B.K.1 ในสภาวะ Mixotrophic ที่ความเข้มแสง 1750 ลักซ์ มีปริมาณโปรตีนสูงกว่าการเจริญในสภาวะ Heterotrophic ในที่มืด

7. การเปรียบเทียบการเพาะเลี้ยง Chlorella sp. B.K.1 ในสภาวะต่าง ๆ ที่ผันแปรแหล่งคาร์บอนและความเข้มแสง

จากสภาวะการเพาะเลี้ยงในสภาวะต่าง ๆ ทั้ง 5 แบบ คือ Autotrophic ที่ความเข้มแสง 3500, 1750 ลักซ์ Heterotrophic ในที่มืด Mixotrophic ที่ความเข้มแสง 3500, 1750 ลักซ์ พบว่าจำนวนเซลล์เริ่มต้นเฉลี่ยในสภาวะการเพาะเลี้ยงในสภาวะต่าง ๆ มีค่าใกล้เคียงกันคืออยู่ในช่วง $1.4-3.7 \times 10^8$ เซลล์ต่อมล. ยกเว้นในการเพาะเลี้ยงในสภาวะ Autotrophic ที่ความเข้มแสง 1750 ลักซ์ มีจำนวนเซลล์เริ่มต้นเฉลี่ย 5.9×10^8 เซลล์ต่อมล. ซึ่งมากกว่าการเพาะเลี้ยงในสภาวะอื่น อันอาจจะเกิดการบังแสงระหว่างเซลล์ซึ่งกันและกันได้ แต่อย่างไรก็ดีจากการวัดความขุ่นที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ในวันแรกมีค่าเท่ากับ 0 และปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ 250 มล. ในขวดแก้วทรงกรวยขนาด 500 มล. เป็นปริมาตรอาหารที่น้อยแต่มีพื้นที่ผิวในการรับแสงมากเมื่อเทียบกับความสูงของอาหาร ซึ่งโอกาสที่จะเกิดการบังแสงระหว่างเซลล์น่าจะมีน้อยมาก ดังนั้นการที่ Chlorella sp. B.K.1 ในสภาวะ Autotrophic ที่ความเข้มแสง 1750 ลักซ์ มีการเจริญและผลผลิตต่ำสุดไม่ควรเกิดจากการบังแสงระหว่างเซลล์ แต่น่าจะเกิดจากการมีแสงไม่เพียงพอเพียงอย่างเดียว

จากสภาวะการเพาะเลี้ยงในสภาวะต่าง ๆ ทั้ง 5 แบบ คือ Autotrophic ที่ความเข้มแสง 3500, 1750 ลักซ์ Heterotrophic ในที่มืด Mixotrophic ที่ความเข้มแสง 3500, 1750 ลักซ์ พบว่าการเพาะเลี้ยงในสภาวะ Mixotrophic ที่ความเข้มแสง 1750 ลักซ์ จะให้ค่าการเจริญและผลผลิตมากกว่าการเพาะเลี้ยงในสภาวะอื่นโดยมีค่าต่างๆดังนี้ ค่าอัตราการ

เจริญจำเพาะ 0.032 ชม.$^{-1}$ ปริมาณโปรตีนทั้งวิธีแบรดฟอร์ด และวิธีการวัดค่าดูดกลืนแสงอุลตราไวโอเลต 55.34 และ 55.53 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อน้ำหนักแห้ง) ตามลำดับ ส่วนค่าผลผลิตจะเท่ากับ 6.871 ไมโครกรัมต่อมล.ต่อชม. ซึ่งไม่ต่างจากผลผลิตของการเพาะเลี้ยงในสภาวะ Autotrophic ที่ 3500 ลักซ์ ซึ่งเท่ากับ 7.010 ไมโครกรัมต่อมล.ต่อชม. (ภาคผนวก ค)

ตามที่ Endo และคณะ (1977) และ Ogawa และ Aiba (1981) กล่าวว่าอัตราการเจริญจำเพาะของการเพาะเลี้ยงในสภาวะ Mixotrophic เป็นผลรวมของอัตราการเจริญจำเพาะของการเพาะเลี้ยงในสภาวะ Autotrophic และ Heterotrophic นั้นจะเกิดขึ้นภายใต้ความเข้มแสงที่อยู่ต่ำกว่าจุดอิ่มตัวเท่านั้น (Killam และ Myers, 1956 อ้างถึงใน Ogawa และ Aiba, 1981; Samejima and Myers, 1958) ซึ่งจุดอิ่มตัวนี้จะเป็นลักษณะเฉพาะของแต่ละสายพันธุ์ของสาหร่าย ในการทดลองนี้เลี้ยง <u>Chlorella</u> sp. B.K.1 พบว่าที่ความเข้มแสง 1750 ลักซ์ ค่าอัตราการเจริญจำเพาะของการเพาะเลี้ยงในสภาวะ Mixotrophic จะมากกว่า ค่าอัตราการเจริญจำเพาะของการเพาะเลี้ยงในสภาวะ Autotrophic และ Hetertrophic แต่ไม่เป็นผลรวมกันดังที่กล่าวข้างต้น ในขณะที่ความเข้มแสง 3500 ลักซ์ ค่าอัตราการเจริญจำเพาะของการเพาะเลี้ยงในสภาวะ Mixotrophic จะน้อยกว่าค่าอัตราการเจริญจำเพาะของการเพาะเลี้ยงในสภาวะ Autotrophic และ Heterotrophic ดังนั้นการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าที่ความเข้มแสง 3500 ลักซ์ อาจจะเป็นจุดอิ่มตัวหรือเกินจุดอิ่มตัวของ <u>Chlorella</u> sp. B.K.1

แต่ในการเพาะเลี้ยงในระดับอุตสาหกรรมนั้น จะเป็นการเลี้ยงโดย ใช้แสงจากแสงอาทิตย์ซึ่งในเวลากลางวัน จะมีค่าประมาณ 30000 ลักซ์ ซึ่งมากกว่าที่ใช้ในห้องปฏิบัติการมาก ซึ่งจะต้องมีการปรับปรุงความเข้มข้นของกรดแอซีติกและอัตราการให้คาร์บอนไดออกไซด์แก่อาหารเลี้ยงเชื้อให้เหมาะสมกับสภาวะแสงภายนอก เพื่อป้องกันการเกิดยับยั้งการเจริญเหมือนกับการเจริญในการเพาะเลี้ยงในสภาวะ Mixotrophic ที่ 3500 ลักซ์ในการทดลอง

8. <u>การเลี้ยง Chlorella sp. B.K.1 ในสภาวะ Heterotrophic ในที่มืดโดยใช้กรดแอซีติกเป็นแหล่งคาร์บอน และใช้ยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจน</u>

จากการทดลองสุ่มหาความเข้มข้นของยูเรีย (ตารางที่ 23) พบว่าที่ความเข้มข้น 0.93, 1.87 และ 3.74 มิลลิโมลาร์ จะให้ค่าอัตราการเจริญจำเพาะสูงกว่าความเข้มข้นอื่น

จึงเลือกช่วงความเข้มข้น 0, 0.93, 1.87 และ 3.74 มิลลิโมลาร์ มาทำการทดลองใหม่ ความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ เพื่อหาค่าที่ให้การเจริญและผลผลิตสูง

จากการทดลองพบว่าที่ความเข้มข้นยูเรีย 1.87 และ 3.74 มิลลิโมลาร์ จะให้ค่าผลผลิต, ปริมาณโปรตีนไม่ต่างกัน แต่ที่ความเข้มข้น 1.87 มิลลิโมลาร์ มีค่าอัตราการเจริญจำเพาะสูงกว่าที่ความเข้มข้น 3.74 มิลลิโมลาร์ คือ มีค่า 0.022 และ 0.016 ชม.-1 ตามลำดับ ส่วนที่ความเข้มข้น 0.93 มิลลิโมลาร์ มีอัตราการเจริญจำเพาะไม่ต่างกับที่ความเข้มข้น 1.87 มิลลิโมลาร์ ส่วนผลผลิตจะไม่ต่างจากความเข้มข้นอื่น แต่มีปริมาณโปรตีนต่ำกว่าที่ความเข้มข้น 1.87 และ 3.74 มิลลิโมลาร์ ทั้งนี้เพราะในภาวะที่มีแหล่งไนโตรเจนน้อย เซลล์จะมีปริมาณโปรตีนลดลง แต่จะมีกรดไขมันคาร์โบไฮเดรตเพิ่มขึ้น (Oh-Hama and Miyachi,1988)

การที่ความเข้มข้นของยูเรียที่ 3.74 มิลลิโมลาร์ มีอัตราการเจริญจำเพาะต่ำกว่าที่ 1.87 และ 0.93 มิลลิโมลาร์ นั้นเกิดเพราะการที่ความเข้มข้นของยูเรียสูง จึงทำให้เกิดการยับยั้งการเจริญของเซลล์ (Nakamura, 1981c)

จากผลการทดลองจึงเลือกยูเรียที่ความเข้มข้น 1.87 มิลลิโมลาร์ มาใช้เลี้ยง <u>Chlorella</u> sp. B.K.1 เปรียบเทียบกับแอมโมเนียมไนเตรต ที่ความเข้มข้น 1.87 มิลลิโมลาร์ ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่ใช้ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Beijerinck ในการเพาะเลี้ยงในสภาวะ Heterotrophic ในที่มืด

9. <u>เปรียบเทียบการเลี้ยง Chlorella sp. B.K.1 ในสภาวะ Heterotrophic ในที่มืดในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Beijerinck โดยใช้แอมโมเนียมไนเตรต หรือยูเรีย เป็นแหล่งไนโตรเจน</u>

ในการทดลองจะเปรียบเทียบแหล่งไนโตรเจนทั้งสองที่ความเข้มข้น 1.87 มิลลิโมลาร์ ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่เท่ากับที่ใช้ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Beijerinck

จากผลการทดลองพบว่า อัตราการเจริญจำเพาะ และผลผลิตของแอมโมเนียมไนเตรตที่ความเข้มข้น 1.87 มิลลิโมลาร์ จะมากกว่ายูเรียที่ความเข้มข้นเท่ากัน โดยอัตราการเจริญจำเพาะของแอมโมเนียมไนเตรตมีค่าเท่ากับ 0.028 ชม.-1 และผลผลิตเท่ากับ 3.093 ไมโครกครัมต่อมล.ต่อชม. และของยูเรียมีอัตราการเจริญจำเพาะเท่ากับ 0.022 ชม.-1 และผลผลิตเท่ากับ 2.228 ไมโครกรัมต่อมล.ต่อชม. แต่มีปริมาณโปรตีนไม่ต่างกันคือมีค่าประมาณ 41 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อน้ำหนักแห้ง)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ซึ่งเมื่อดูจากรูปที่ 42 และ 43 จะเห็นว่าให้ผลที่ไม่สอดคล้องกันคือ รูปที่ 42 แสดงจำนวนเซลล์ต่อมล.จะเห็นว่าการใช้แอมโมเนียมไนเตรตและยูเรียจะให้จำนวนเซลล์ใกล้เคียงกัน แต่จากรูปที่ 43 ซึ่งแสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตรจะพบว่าการใช้แอมโมเนียมไนเตรต จะให้ค่าการดูดกลืนแสงมากกว่าการใช้ยูเรีย ซึ่งเกิดเนื่องจากการเลี้ยง Chlorella sp. B.K.1 ด้วยยูเรียเซลล์จะมีขนาดเล็กกว่าการเลี้ยงด้วย แอมโมเนียมไนเตรต ซึ่งสามารถสังเกตได้จากการเทียบน้ำหนักแห้งทั้งหมดของเซลล์ที่เจริญโดยใช้แอมโมเนียมไนเตรต และยูเรียจะเท่ากับ 593.86 และ 374.30 ไมโครกรัมต่อมล. จะเห็นว่า น้ำหนักแห้งของ Chlorella sp. B.K.1 ที่เลี้ยงด้วยแอมโมเนียมไนเตรตจะมากกว่าที่เลี้ยงด้วยยูเรียแสดงว่า การเลี้ยง Chlorella sp. B.K.1 ในสภาวะ Heterotrophic ที่ความเข้มข้นแอซิติก 30 มิลลิโมลาร์ โดยใช้อาหารสูตร Beijerinck แอมโมเนียมไนเตรต เหมาะที่จะเป็นแหล่งไนโตรเจนมากกว่ายูเรีย

Chlorella sp. B.K.1 ที่เลี้ยงในสภาวะ Heterotrophic ที่ความเข้มข้นแอซิติก 30 มิลลิโมลาร์ ที่อัตราการให้อากาศ 60 มล.ต่อนาที โดยใช้อาหารสูตร Beijerinck จะใช้แอมโมเนียมไนเตรตได้ดีกว่ายูเรีย เพราะในการนำยูเรียมาใช้นั้น เซลล์ต้องทำการแยกยูเรียให้เป็น แอมโมเนียมอิออน และ ไบคาร์บอเนตอิออน โดยใช้เอ็นไซม์ ATP:urea amidolyase ซึ่งประกอบด้วยสองเอ็นไซม์ คือเอ็นไซม์ urea carboxylase และเอ็นไซม์ allophanate amidohydrolase ซึ่งจะต้องใช้ ATP และ ไบคาร์บอเนตอิออน (Thompson และ Muenster ,1971) แต่การทดลองนี้เลี้ยง Chlorella sp.B.K.1 ในสภาวะ Heterotrophic ซึ่งไม่มีการให้แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ ดังนั้นไบคาร์บอเนตอิออนที่เอ็นไซม์ ATP:urea amidolyase ต้องการซึ่งอาจได้มาจากการหายใจ และ อากาศที่ใช้กวนอาหารเลี้ยงสาหร่าย อาจมีไบคาร์บอเนตอิออนไม่เพียงพอดังนั้น Chlorella sp. B.K.1 ที่เลี้ยงด้วยยูเรียในภาวะ Heterotrophic จึงมีการเจริญเติบโตและผลผลิตน้อยกว่าที่เลี้ยงด้วยแอมโมเนียมไนเตรต

สรุปผลการทดลอง

1. แยกและจำแนก Chlorella sp. B.K.1 ได้จากสระน้ำข้างเรือนต้นไม้ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ซึ่งมีลักษณะคล้าย Chlorella ellipsoidea

2. การเพาะเลี้ยง Chlorella sp. B.K.1 ในสภาวะ Autotrophic ที่

ความเข้มแสง 3500 ลักซ์ จะมีการเจริญและผลผลิตดีที่สุด ที่การให้อากาศผสม 1 เปอร์เซ็นต์คาร์บอนไดออกไซด์ ที่อัตรา 60 มล.ต่อนาที

3. การเพาะเลี้ยง Chlorella sp. B.K.1 ในสภาวะ Heterotrophic ในที่มืด จะมีการเจริญและผลผลิตดีที่สุด ที่ความเข้มข้นกรดแอซีติก 30 มิลลิโมลาร์

4. การเพาะเลี้ยง Chlorella sp. B.K.1 ในสภาวะ Mixotrophic ที่ความเข้มแสง 3500 ลักซ์ มีอัตราการเจริญจำเพาะน้อยกว่า อัตราการเจริญจำเพาะของการเจริญในสภาวะ Autotrophic ที่ความเข้มแสง 3500 ลักซ์และ Heterotrophic ในที่มืด

5. การเพาะเลี้ยง Chlorella sp. B.K.1 ในสภาวะ Mixotrophic ที่ความเข้มแสง 1750 ลักซ์ มีอัตราการเจริญจำเพาะมากกว่า อัตราการเจริญจำเพาะของการเจริญในสภาวะ Autotrophic ที่ความเข้มแสง 1750 ลักซ์และ Heterotrophic ในที่มืด และให้ปริมาณโปรตีนสูงสุดคือ 55 เปอร์เซ็นต์

6. Chlorella sp. B.K.1 สามารถใช้แอมโมเนียมไนเตรตที่ความเข้มข้น 1.87 มิลลิโมลาร์ ได้ดีกว่ายูเรียที่ความเข้มข้นเดียวกัน ภายใต้สภาวะการเพาะเลี้ยงแบบ Heterotrophic ในที่มืด

ข้อเสนอแนะ

1. ในการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดยวิธีแบรดฟอร์ด และ วิธีวัดค่าการดูดกลืนแสงอุลตราไวโอเลต ที่ได้จากการแตกเซลล์ด้วยเครื่องกำเนิดเสียงความถี่สูงนั้นจะวัดได้เพียงปริมาณโปรตีนที่ละลายน้ำได้เท่านั้น ส่วนโปรตีนที่ไม่ละลายน้ำจะติดอยู่ที่ผนังเซลล์ ดังนั้นถ้าจะวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดยสองวิธีนี้ควรเติม โซเดียมไฮดรอกไซด์ ในเซลล์ที่จะนำไปโซนิเคท เพื่อช่วยทำให้เซลล์แตก และ ถูกย่อยได้ดีขึ้น ซึ่งจะทำให้โปรตีนหลุดจากผนังเซลล์ได้

2. ควรมีการขยายขนาดการเพาะเลี้ยงให้มีปริมาณมากขึ้น

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย